

以模板活性染色质转移家蚕基因的研究*

李振刚 吴秋莺 王为民 康 凡

(中国科学技术大学生物系, 合肥)

吴 健 范久戈 陶万珍

(安徽省农科院蚕桑研究所, 合肥)

摘要 一定的组织中仅仅转录一定的基因, 组织中那些进行转录的染色质区域称为模板活性染色质。因此, 只要选择一定的组织提取模板活性染色质, 就可获得预期的基因。我们从红茧蚕(沔阳红带 P_k 基因)五龄幼虫的丝腺组织中提取模板活性染色质, 用显微注射技术转移到黄茧蚕(巴陵黄)的受精卵中, 观察到了能结红茧的变异体并已传至 F_3 代; 说明 P_k 基因被成功地转移并能传递给子代。另外, 以普通褐卵(苏春)的活性染色质注射到白卵(云纹皮斑)受精卵中, 也得到了黑卵变异。利用分离模板活性染色质来转移预期基因的技术, 可能为真核生物的基因转移提供一个新的途径。

关键词 模板活性染色质 基因转移 显微注射

以染色体为载体的基因转移, 已经提出十余年(McBrude 和 Ozer, 1973)。它说明染色体片段是转移基因的理想载体。我们进一步分离模板活性染色质进行基因转移, 克服了使用全染色体或全 DNA 溶液时预期基因表达的盲目性与低频率。例如家蚕五龄幼虫的丝腺细胞中, 丝心蛋白等基因正处于旺盛的转录状态(Suzuk 和 Giza, 1976); 如果这时从丝腺中提取模板活性染色质, 就会得到一个能够表达丝质性状的基因群。

目前在家蚕的基因转移实验中, 是用医用注射器把 DNA 全溶液注射到五龄幼虫的体腔中, 并获得了变异体(Nawa 等, 1971; Chen 等, 1982)。由于使用的是含有整个基因组的 DNA 全溶液, 转移的基因完全是随机的, 其中所含的特定基因所占比例极少, 估计在 0.01% 以下, 表达的机率因此就更低。而利用模板活性染色质转移技术, 可以有目的的转移某些基因, 进一步克服基因转移中的盲目性, 为真核生物的基因转移提供一种新的途径。本文报道在家蚕(*Bombyx mori* L.) 中这方面试验的结果。

材 料 与 方 法

1. 材料

我们从红茧蚕(沔阳红)的早期五龄幼虫丝腺组织中提取模板活性染色质, 然后注射到黄茧蚕(巴陵黄)的受精卵中, 期望得到 P_k 、F 基因的转移与表达。另外, 从普通褐卵(苏春)中, 在产卵 8 小时以后提取活性染色质注射到受精的白卵(云纹皮斑)中, 以观察普

本文于 1986 年 5 月收到。

* 本项研究由安徽省科委资助。

本工作早期曾得到科技大学生物系郭文彤、苏代荣、顾月华、鲁润龙等同志的协助, 特此致谢。

通褐卵基因 (bo) 的转移与表达 (见表 1)。

表 1 二对家蚕品种的有关基因及性状

品 种		性 状	提取活性染色质的组织	预期要转移的基因	预期要表达的性状
I	沔 阳 红	红茧	丝 腺	P_k, F	
	巴 陵 黄	黄茧			红茧或肉色茧
II	苏 春		卵	bo	
	云纹皮斑				黑 卵

2. 方法

染色质的分离依 Marushige 与 Bonner (1966) 方法, 整个实验须在 $1-4^{\circ}\text{C}$ 下进行。取沔阳红蚕五龄幼虫的丝腺组织, 加入三倍体积的 EDTA 盐溶液 (0.075mol/L NaCl , 0.024mol/L EDTA 钠盐, $\text{pH}8$), 在组织捣碎机中以全速 (200V) 匀浆一分钟, 然后降至 100V 匀浆 4 分钟, 用二层尼龙布过滤二次, 取滤液以 1500g 离心 15 分钟。所得沉淀以等量的 EDTA 液及 Tris-HCl 缓冲液 (0.01mol/L , $\text{pH}8$) 离心洗涤。最后把沉淀悬浮于 Tris-HCl 缓冲液中, 以玻璃匀浆器匀浆, 10000g 离心 15 分钟。上述操作重复一次。所得沉淀仍悬浮于 Tris-HCl 缓冲液中, 进行蔗糖密度梯度离心; 离心管中先放入 $4/5$ 体积的蔗糖液 (1.7mol/L 蔗糖、 0.01mol/L Tris-HCl、 0.2mmol/L EDTA , $\text{pH}8$), 在其上面置 $1/5$ 体积的粗染色质悬浮液, 轻轻搅混界面, 经 70000g 离心 3 小时, 即得纯化的染色质。纯的染色质在电泳中为单一带。其 $\text{O.D.}320/\text{O.D.}260$ 的比值小于 0.1。

模板活性染色质的分离依 McConaughy 与 McCarthy (1972) 法。将纯化的染色质沉淀悬浮于 0.12mol/L ($\text{pH}8$) 的磷酸盐缓冲液中, 在冰箱中对同一溶液透析过夜。然后把染色质在刀匀浆器中匀浆 90 秒, 置冰箱中电磁搅拌 30 分钟, 10000g 离心 30 分钟, 取上清液。将此染色质溶液通过 0.12mol/L 磷酸盐缓冲液的羟基磷灰石层析柱, 该柱外有热夹层。开始时温度为 60°C , 然后逐渐加温, 在 $70-75^{\circ}\text{C}$ 时洗脱下来的组分即为模板活性染色质。非模板活性染色质组分待温度上升到 $80-95^{\circ}\text{C}$ 时才洗脱下来。此法所得染色质片段中, DNA 的平均分子量为 8×10^6 daltons, 约含 12000 碱基对, 其组蛋白将因热降解而不完整。将此染色质液对昆虫 Ringer 液 (Chan 等, 1971) 透析过夜后, 冷冻干燥。然后以 Ringer 液溶解, 使最终浓度为 $100\mu\text{gDNA/ml}$ 。

注射蚕卵在产卵后 8 小时之内进行。蚕卵注射前先置于硅胶干燥器中干燥 20 分钟, 所用的显微注射玻璃微管, 其末端直径 $30\mu\text{m}$ 左右。管内含有二根经电解后末端变尖的钨丝; 一根的直径 $20\mu\text{m}$, 用防水胶固定于管的内壁, 其尖端伸出管外约 $15\mu\text{m}$; 另一根直径约 $5\mu\text{m}$, 可伸出或缩进微管。注射时先以粗钨针刺破卵壳, 微管随之插入卵内, 以不刺破卵膜为度, 然后把 $5\mu\text{m}$ 的钨针推入卵膜, 迅即缩回, 与此同时通过微管注入染色质。注入量约 $10^{-2}\mu\text{l}$ 。注射后将卵置于 25°C 温室中, 待卵转为黑褐色即表明已经成活 (白卵品种例外)。在对照实验中, 受试卵仅注入等量的昆虫 Ringer 液 (Chan, 等, 1971)。

结 果

实验结果表明(见图 1、2 和表 2)，在注射的当代 (F_1)，预期的标志性状(红茧、黑卵)

表 2 家蚕卵显微注射后茧色及卵色预期性状的表达情况

品 种	被注卵数	成活的幼虫数或卵数	预期的 F_1 转化体数		转 化 率
			黑 卵	红 茧	
沔阳红与巴陵黄	1586	968 只		3	0.3%
苏春与沔纹皮斑	675	512 粒	4		0.78%

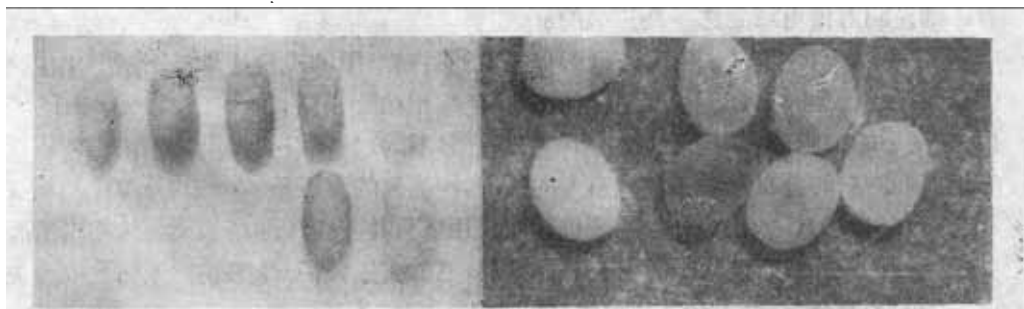


图 1 上排是巴陵黄蚕卵注射沔阳红丝腺活性染色质后的蚕茧。右起第一个为转化体红茧，颜色较淡。第二至五为黄茧，黄色深浅程度不同。下排为标准的沔阳红(右)和巴陵黄(左)蚕茧。(照片是以彩色底版进行的黑白放大，偏黑的实际是黄色，偏白的实际是红色)。

图 2 沔纹皮斑蚕卵(白卵)注射苏春蚕卵的模板活性染色质后出现的黑卵。

均有不同程度的表达，说明外源基因已得到成功的转移。在被注射的 1,586 粒巴陵黄卵中，共结出 968 个茧，其中有三枚红茧，其他都是黄茧。但有些黄茧的颜色在深浅程度上有所差异(见图 1)。由三枚红茧中仅羽化出一雌一雄；交配后得 502 粒卵，结出的 410 个茧中得四枚红茧，羽化出雌雄蛾各二个，但只一雌与二雄先后交配，共产卵 262 粒，结出的 158 个茧中有二枚红茧。自 F_1 至 F_3 代，红茧出现频率分别为 0.3%、0.9% 和 1.2%。

另外，以苏春(普通褐卵)蚕蛾产出后 8 小时的卵(此时为淡黄色)提取活性染色质注入沔纹皮斑蚕(白卵品系)的卵中，注射时间为产卵后 3 小时左右。共注射 675 粒，成活 512 粒，其中有 4 粒黑卵。众所周知，决定卵色的主要因素是浆膜的着色情况，而浆膜是受精后胚胎发育的产物，它的遗传型属于 F_1 代。因此，在白卵系中有黑卵出现，说明苏春蚕的普通褐卵基因 (bo ，卵色黑褐)已成功地转移到白卵(沔纹皮斑蚕)中并在 F_1 表达。

根据红茧基因 (P_k) 在 F_1 至 F_3 的传递情况，说明染色质注射后的基因转移与传递是外源基因与宿主染色体不断地相互作用的复杂过程。在此过程中不仅有外源基因的逐步丢失，还有外源基因整合到哪条染色体上，整合进去多少，什么位置等一系列问题，这不能用一般的有性杂交法则预测。

讨 论

在我们前期工作的基础上(李振刚等, 1986), 本文的结果进一步说明模板活性染色质的转移可以作为在高等生物间有选择地转移外源基因的一种有效手段。该方法较基因工程技术简捷, 并能在不了解基因序列及 mRNA 的情况下进行, 我们把它称为染色质工程。

染色质工程的关键是对预期基因供体组织的精确选择。一般地说, 只要某种蛋白质分子在组织中持续地增加, 那么其相应的基因在该组织中就是处于转录状态。但在某些情况下, 基因的转录与表达可能不在同一时期或同一组织中进行, 这需要进行细致的遗传分析, 必要时可以进行选择性杂交的体外翻译(Alwine, 1977)。方法是把同一组织的模板活性染色质的 DNA 与细胞质中的全部 mRNA 进行杂交, 然后把能与 DNA 相杂交的那些 mRNA 进行体外翻译, 以放射自显影检测有无预期基因所表达的蛋白质分子; 如果有, 则说明对该组织的选择是正确的。

关于模板活性染色质转化的机制, 以我们目前有限的实验结果还不能得出结论。我们认为染色质进入后, 以不同程度与受体染色体相结合, 有的结合比较牢固, 有的则很脆弱, 在随后的细胞分裂中, 可能会分离、消失。目前, 我们正以荧光染料标记染色质, 跟踪它进入细胞后的分布及对染色体整合的情况。类似的观点是 Fox 的外源体模型(Fox, 和 Yoon, 1970), 他认为外源的遗传物质, 片段只是与受体的同源染色体相联结而没有整合到染色体的线状结构中时, 由于联结或复制的失败, 外源体将在许多细胞中消失, 因而得到的是嵌合体, 而不会是完整性状的表达。

参 考 文 献

- 李振刚等 1986 利用模板活性染色质转移外源基因的研究。生物工程学报 2(4): 22—8。
- Alwine, J. C. 1977 Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3530—4.
- Chan, L-N et al. 1971 Determination of blastoderm cells in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2217—21.
- Chen, Y. L. et al. 1982 Study on hereditary variations induced by silkworm DNA. *Scientia Sinica* 25: 141—51.
- Fox, A. S. & S. B. Yoon 1970 DNA-induced transformation in *Drosophila*: Locus-specificity and the establishment of transformed stocks. *Proc. Acad. Sci. USA* 67: 1608—15.
- Marushige, K. & J. Bonner 1966 Template properties of liver chromatin. *J. Mol. Biol.* 15: 160—74.
- McBrude, O. W. & H. L. Ozer 1973 Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1258—62.
- McConaughy, B. L. & B. J. McCarthy 1972 Fraction of chromatin by thermal chromatography. *Biochemistry* 11: 998—1003.
- Nawa, S. et al. 1971 Hereditary change in *Bombyx* after treatment with DNA. *Genetics* 67: 221—34.
- Suzuki, Y. & P. E. Giza 1976 Accentuated expression of silkworm fibron genes *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 107: 183—206.

STUDIES ON GENE TRANSFER BY TEMPLATE-ACTIVE CHROMATIN IN SILKWORM *BOMBYX MORI*

LI ZHEN-GANG WU QIU-YING WANG WEI-MIN KANG FAN

(Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei)

WU JIAN FAN JIU-GE TAO WAN-JIN

(Sericultural Research Institute of Anhui Province, Hefei)

Experiments of gene transfer were performed in different strains of the silkworm *Bombyx mori*. The template-active chromatin from the silk glands of the larvae in fifth instar of Mianyang Red (red cocoon, with P_k gene) was isolated and transferred into the eggs of Baling Yellow (yellow cocoon) by microinjection, and that from the eggs of Suchuen (black egg, with bo gene) was transferred into the eggs of Yuwen Piban (white egg). The expected results of successful transfer of the genes are envisaged in the appearance of red cocoons in Baling Yellow and of black eggs in Yuwen Piban. Our results show that the character of red cocoon and thus the P_k gene can be transferred into Baling Yellow and transmitted to the third generation of progeny. Likewise black eggs were obtained among the white eggs of Yuwen Piban. Therefore, both the gene P_k and the gene bo can be transferred with success, as shown in their expression of the respective cocoon and egg colors. Presumably this technique can lead to a new approach of gene transfer in other eukaryotes.

Key words template-active chromatin—gene transfer—microinjection